

1/5/1 (Item 1 from file: 351)  
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2006 The Thomson Corp. All rts. reserv.

013700917

WPI Acc No: 2001-185141/ 200119

Related WPI Acc No: 1999-072881

XRAM Acc No: C01-055890

New human-derived sialate transferase for transferring sialic acid to the

3-OH of the galactose residue

Patent Assignee: SEIKAGAKU KOGYO CO LTD (SEKG ); SAITO M (SAIT-I)

Inventor: SAITO M

Number of Countries: 002 Number of Patents: 003

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date
JP 2000333682	A	20001205	JP 99148603	A	19990527
200119 B					
US 6555371	B1	20030429	US 98112563	A	19980709
200331			US 99425488	A	19991022
US 20030087396	A1	20030508	US 98112563	A	19980709
200337			US 99425488	A	19991022
			US 2002309389	A	20021203

Priority Applications (No Type Date): JP 99148603 A 19990527;  
JP 97184184 A  
19970709

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 2000333682	A		15	C12N-015/09	
US 6555371	B1			C12N-015/54	CIP of application US
98112563					
US 20030087396	A1			C12P-021/06	CIP of application US
98112563					
					Cont of application US
99425488					

Abstract (Basic): JP 2000333682 A

NOVELTY - A sialate transferase containing a polypeptide (I)

containing amino acids 41 to 362 of a sequence (S1) of 362 amino acids,

given in the specification, having an activity of transferring sialic

acid to the 3-OH of the galactose residue, is new.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(1) a sialate transferase containing a polypeptide at least containing a sequence of 48 amino acids, given in the specification, and having an activity of transferring sialic acid to the 3-OH of the galactose residue,

(2) (I) containing amino acids 41 to 362 in (S1);

(3) a polypeptide having the sequence of (S1);

(4) a DNA encoding (3);

(5) a recombinant vector containing (3);

(6) a transformant in which (3) is introduced and can be expressed; and

(7) preparing sialate transferase or its polypeptide in which (6) is cultured in a suitable medium to form and accumulate the sialate transferase encoded by the DNA or its polypeptide in the culture and the sialate transferase or its polypeptide is collected from the culture.

USE - The sialate transferase is used for transferring sialic acid to the 3-OH of the galactose residue. The DNA encoding sialate transferase or its polypeptide can be used for elucidating the mechanism of cell differentiation.

pp; 15 DwgNo 0/4

Title Terms: NEW; HUMAN; DERIVATIVE; TRANSFERASE; TRANSFER; SIALIC; ACID; GALACTOSE; RESIDUE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09; C12N-015/54; C12P-021/06

International Patent Class (Additional): C07H-021/04; C08B-037/00;

C12N-001/21; C12N-005/10; C12N-009/10; C12P-019/26; C12R-001-19;

C12R-001-91

File Segment: CPI

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-333682

(P2000-333682A)

(43)公開日 平成12年12月5日(2000.12.5)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
1/21		1/21	4 B 0 5 0
5/10		9/10	4 B 0 6 5
9/10		C 1 2 N 5/00	B

// (C 1 2 N 1/21

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 15 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平11-148603

(22)出願日 平成11年5月27日(1999.5.27)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成10年12月10日  
共立出版株式会社発行の「蛋白質 核酸 酵素 臨時増  
刊号 糖鎖生物学-糖鎖情報発信から受信のメカニズム  
まで V o L . 43 N o . 16」に発表

(71)出願人 000195524

生化学工業株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

(72)発明者 齋藤 政樹

東京都港区三田五丁目7-12-1101

(74)代理人 100089244

弁理士 遠山 勉 (外2名)

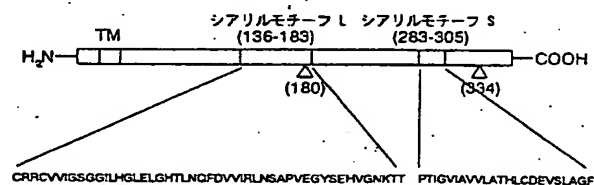
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト由来シアル酸転移酵素及びそれをコードするDNA

(57)【要約】

【課題】 ヒト由来の、ラクトシルセラミドのガラクトース残基にシアル酸を転移してガングリオシドG<sub>M3</sub>を合成する酵素及びその酵素をコードするDNAを提供する。

【解決手段】 癌細胞を分化誘導剤で処理することにより分化させ、分化した癌細胞からcDNAライブラリーを作成して宿主細胞に導入し、ガングリオシドを細胞膜上に発現した宿主細胞を検出し、上記で検出された宿主細胞をソーティングしてライブラリーを濃縮して、濃縮したライブラリーから導入した遺伝子を切り出す。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 2 記載のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号 41～362 のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチドを含み、ガラクトース残基の 3 位水酸基にシアル酸を転移する作用を有するシアル酸転移酵素。

【請求項 2】 配列番号 2 記載のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号 1～362 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む請求項 1 記載のシアル酸転移酵素。

【請求項 3】 ラクトシルセラミドのガラクトース残基にシアル酸を転移して  $\alpha 2 \rightarrow 3$  結合を形成し、ガングリオシド  $G_{M3}$  を生成する活性を有する請求項 1 又は 2 記載のシアル酸転移酵素。

【請求項 4】 配列番号 5 記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチドを含み、ガラクトース残基の 3 位水酸基にシアル酸を転移する作用を有するシアル酸転移酵素。

【請求項 5】 配列番号 2 記載のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号 41～362 のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチド。

【請求項 6】 配列番号 2 記載のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号 1～362 のアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項 7】 請求項 5 又は 6 記載のポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 8】 配列番号 1 記載の塩基配列を有する DNA。

【請求項 9】 請求項 7 又は 8 記載の DNA を含む組換えベクター。

【請求項 10】 請求項 7 又は 8 記載の DNA が導入され、かつ該 DNA が発現可能な形質転換体。

【請求項 11】 請求項 10 記載の形質転換体を、好適な培地で培養し、前記 DNA がコードするシアル酸転移酵素又はそのポリペプチドを培養物中に生成蓄積させ、その培養物からシアル酸転移酵素又はそのポリペプチドを採取することを特徴とする、シアル酸転移酵素又はそのポリペプチドの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、シアル酸転移酵素及びそれをコードする DNA に関する。より詳細にはラクトシルセラミドのガラクトース残基にシアル酸を転移してガングリオシド  $G_{M3}$  を合成する酵素及びその酵素をコードする DNA に関する。

## 【0002】

【従来の技術】ヒト骨髓性白血病細胞株 HL-60 は悪性転換により無限増殖能を獲得した細胞株であり、白血病細胞のモデルとして一般的に広く用いられている (Collins, S.J., Gallo, R.C., and Gallagher, R.E., Nature (London), 270, 347-349(1977); Collins, S.J., Bl

ood, 70, 1223(1987))。上記細胞株は、培養を続けた際にも分化することはなく未分化な細胞のまま増殖を続けるが、上記細胞株の培養培地に分化誘導剤として広く用いられているホルボールエステルを添加して培養を続けると、細胞増殖を停止し、単球或いはマクロファージと同様な形態を示すようになり、分化が誘導される。その過程でガングリオシドの一種である  $G_{M3}$  量が顕著に増大すること (Nojiri, H., Takaku, F., Tetsuka, T., and Saito, M., Blood, 64, 534-541(1984))、及び上記ガングリオシド  $G_{M3}$  を外来性に添加した際もホルボールエステルを添加した際と同様の変化、すなわち単球系分化が細胞に起こることが報告されている (Saito, M., Terui, Y., and Nojiri, H., Biochem. Biophys. Res. Commun., 132, 223-231(1985))。また、この分化の過程において、 $G_{M3}$  そのものが分化誘導活性を有していること (Nojiri, H., Takaku, F., Miura, Y., and Saito, M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 782-786(1986))、さらに化学合成  $G_{M3}$  によっても分化が誘導されることが証明されている (Sugimoto, M. and Ogawa, T., Glycoconj. J., 2, 5-9(1985); Saito, M., Nojiri, H., Ogino, H., Yuo, A., Ogura, H., Itoh, M., Tomita, K., Ogawa, T., Nagai, Y., and Kitagawa, S., FEBS Lett., 271, 85-88(1990))。

【0003】一方、シアル酸含有糖脂質、その中でも特にガングリオシドが様々な生物現象において重要な機能を担っていることが明らかとなり、その機能のみならず生合成が解明されつつある。脊椎動物において、多くのガングリオシド (ガングリオ系ガングリオシド) は主要ガングリオシドのうちで最も単純な構造を持つ  $G_{M3}$  を共通の前駆体としており、主要な機能を持つガングリオシドの生合成の根幹を  $G_{M3}$  の合成がなしている。

【0004】上述のようにガングリオシド  $G_{M3}$  はそれ自体が細胞・組織の増殖・分化に関与するとともに脊椎動物においては様々な機能を有するより高級なガングリオシド群の前駆体となっていることが示唆されている。

【0005】 $G_{M3}$  は、CMP-シアル酸：ラクトシルセラミドシアル酸転移酵素 (CMP-NeuAc:Gal  $\beta$ 1-4Glc  $\beta$ 1-1'Cer  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase: SAT-1) によってラクトシルセラミド中のガラクトース残基にシアル酸が転移することによってラクトシルセラミドから合成されると考えられているが、ヒト由来の当該酵素は単離されておらず、またその遺伝子も特定されていない。

【0006】ガラクトシド構造にシアル酸を  $\alpha 2 \rightarrow 3$  ケットシド結合を介して転移する酵素としては、Wienstein et al., J. Biol. Chem., 257, 13835(1982)、Gillespie et al., Glycoconj., 7, 469(1990)、Gillespie, W., Kelm, S. and Paulson, J.C., J. Biol. Chem., 267, p21001-21010(1992)、Lee, Y.C., Kojima, N., Wada, E., Kurosawa, N., Kakaoka, T., Hashimoto, T. and Tsuji, S., J. Biol. Chem., 269, p10028-10033(1994)、Kim, Y.J., Kim,

KS., Kim, SH., Kim, CH., Ko, JH., Choe, IS., Tsuji, S. and Lee, YC., Biochem. Biophys. Res. Commun., 228, p 324-327 (1996)、特開平5-336963号公報などが知られているが、いずれの酵素もG<sub>M3</sub>の合成への関与は知られておらず、ラクトシルセラミドにシアル酸を $\alpha 2-3$ ケトシド結合で転移する酵素活性を示してはいない。Sandhoff, K.らは、 $\alpha 2-8$ シアル酸転移酵素(SAT4)と、G<sub>M3</sub>を合成する酵素が同一であると推定している(J. Biol. Chem., 268, 5341 (1993))が、それは間接的な方法に基づく推定であり、物質として同一であることを裏付けているものではない。

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】ガングリオシドG<sub>M3</sub>の重要性が明らかになるにつれてその生合成を解明、制御する試みがなされてきたが、G<sub>M3</sub>の合成に深く関わる上記シアル酸転移酵素はその酵素タンパク質精製の困難性のため未だヒトからは単離されておらず、遺伝子発現調節機構はもとより、タンパク質化学的解析及び酵素学的解析でさえ未だなされていない。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記シアル酸転移酵素の遺伝子発現調節機構、タンパク質化学的解析及び酵素学的解析を進めることにより、細胞分化の制御を解明すべく鋭意検討を重ねた結果、発現クローニング法により上記G<sub>M3</sub>の合成に関与するシアル酸転移酵素をコードする塩基配列を有するヒト由来のcDNAの単離に成功し、当該cDNAの塩基配列をもとに上記シアル酸転移酵素の構造を明らかにした。その結果、当該酵素が既知のシアル酸転移酵素と相同性が低く、また前記Sandhoff, K.らが同一と推定した $\alpha 2-8$ シアル酸転移酵素とも別の新規酵素であることが明らかとなった。

【0009】すなわち、本発明は、配列番号2記載のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号41～362のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチドを含み、ガラクトース残基の3位水酸基にシアル酸を転移する作用を有するシアル酸転移酵素を提供する。

【0010】本発明のシアル酸合成酵素は、好ましくは、配列番号2記載のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号1～362のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

【0011】本発明のシアル酸合成酵素は、好ましくは、ラクトシルセラミドのガラクトース残基にシアル酸を転移して $\alpha 2 \rightarrow 3$ 結合を形成し、ガングリオシドG<sub>M3</sub>を生成する活性を有する。

【0012】本発明は、また、配列番号5記載のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチドを含み、ガラクトース残基の3位水酸基にシアル酸を転移する作用を有するシアル酸転移酵素を提供する。

【0013】また、本発明は、配列番号2記載のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号41～362のアミノ酸配

列を少なくとも含むポリペプチド及びそれをコードするDNAを提供する。このポリペプチドは、好ましくは、配列番号2記載のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号1～362のアミノ酸配列を有する。上記DNAとしては、配列番号1記載の塩基配列を有するものが挙げられる。

【0014】さらに、本発明は、上記DNAを含む組換えベクター、上記DNAが導入され、かつ該DNAが発現可能な形質転換体、および、この形質転換体を、好適な培地で培養し、上記DNAがコードするシアル酸転移酵素又はそのポリペプチドを培養物中に生成蓄積させ、その培養物からシアル酸転移酵素又はそのポリペプチドを採取することを特徴とする、シアル酸転移酵素又はそのポリペプチドの製造方法を提供する。

【0015】なお、本明細書において「酵素をコードする」とは、当該酵素のポリペプチドをコードすることを意味する。また、本明細書中では、以下、シアル酸供与体からシアル酸受容体であるラクトシルセラミドに含まれるガラクトース残基の3位水酸基へ選択的にシアル酸を転移して $\alpha 2 \rightarrow 3$ 結合を形成しガングリオシドG<sub>M3</sub>を生成する活性を有する本発明のシアル酸転移酵素を便宜的にシアル酸転移酵素-1又はSAT-1とも記載する。

#### 【0016】

【発明の実施の形態】以下に、本発明の実施の形態を説明する。

【0017】<1>本発明のシアル酸転移酵素-1（本発明酵素）及びそれをコードするDNA（本発明DNA）

30 本発明酵素は、配列番号2のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号41～362のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチドを含み、ガラクトース残基の3位水酸基にシアル酸を転移する作用を有する。

【0018】本発明酵素は、通常には、以下のような理化学的性質を有する。

①作用：シアル酸供与体から、シアル酸受容体であるラクトシルセラミドに含まれるガラクトース残基の3位水酸基へ選択的にシアル酸を転移してガングリオシドG<sub>M3</sub>を生成する。すなわち、上記シアル酸受容体のガラクトース残基の3位の水酸基以外には実質的にシアル酸を転移しない。シアル酸供与体としてはCMP-シアル酸が好適には挙げられる。

【0019】好ましくは、さらに、以下のような理化学的性質を有する。

②至適反応pH：本酵素は、実施例中に記載の酵素活性測定方法において、酵素反応液のpH6.0～7.0の範囲、特にpH6.5付近で高いシアル酸転移活性を有する。

③阻害及び活性化：10mM Mn<sup>2+</sup>存在下で、非存在下と比して1.5倍以上に活性が上がる。

【0020】また、本発明酵素には、ガラクトース残基の3位水酸基にシアル酸を転移する作用（好ましくは上記①の作用）を有し、配列番号5のアミノ酸配列を少なくとも含むポリペプチドを含むものも包含される。配列番号5のアミノ酸配列は一般的にシアル酸転移酵素に存在するいわゆるシアリルモチーフに相当する配列であり、通常には、シアル酸転移酵素-1のポリペプチドのアミノ酸配列において、配列番号2のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号136～183の部分に相当する部分に存在する。

【0021】本発明DNAには、上記のポリペプチドをコードしているものが包含され、これらのポリペプチドをコードしているのであればその塩基配列は特に限定されない。

【0022】すなわち、配列番号2のアミノ酸配列は、ガラクトース残基の3位水酸基へシアル酸を転移する活性を実質的に害さない1もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよく、そのようなアミノ酸配列の置換、欠失、挿入又は転位を有するポリペプチドをコードする、塩基配列の置換、欠失、挿入及び転位を有するDNAのいずれもが本発明DNAに包含される。本明細書における「アミノ酸の数個」とは当該酵素の活性が失われない程度の、変異を起こしてもよいアミノ酸の数を示し、例えば360アミノ酸残基からなるポリペプチドの場合、20程度以下、好ましくは10程度以下の数を示す。当該酵素の活性の測定法は公知の方法（特開平7-327678号公報）において宿主細胞に導入するcDNAと酵素の基質を変更することによって容易に行うことが可能であり、例えば本明細書中において具体的に示した方法により当業者であれば容易に実施可能であるため、目的とする酵素活性の有無を指標として、該活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を容易に選択することができる。DNAの塩基配列の置換、欠失、挿入又は転位は、両末端に制限酵素切断末端を持ち、変異点の両側を含む配列を合成し、未変異DNAが有する塩基配列の相当する部分と入れ換えることにより、DNAに導入することができる。また、部位特異的変異法（Kramer, W. and Frits, H. J., Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T. A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987)) などの方法によっても、DNAに置換、欠失、挿入又は転位を導入することができる。

【0023】また、配列番号2のアミノ酸配列は、ヒト由来のものであるが、個体間においてアミノ酸配列に活性に影響を与えない相違があり得ること（同等の活性の変異体が存在し得ること）が当然に予想される。従って上記のガラクトース残基の3位水酸基へシアル酸を転移する活性を実質的に害さない1もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位は、個体間変異程度の範囲内であることが好ましい。

【0024】本発明DNAとして具体的には配列番号2のアミノ酸配列の全てをコードする塩基配列又はその部分塩基配列を有するDNAが挙げられ、かつ好ましいがこれに限定はされない。上記の「部分塩基配列を有するDNA」とは、例えばシアル酸転移酵素-1のポリペプチド（特に、配列番号2のアミノ酸配列においてアミノ酸番号30～362、38～362、41～362又は136～183のアミノ酸配列の部分）をコードするDNAとハイブリダイズしシアル酸転移酵素-1のDNAを検出するためのプローブとして使用することができる又はそれによってコードされるポリペプチドがシアル酸転移酵素-1活性を有するあるいはシアル酸転移酵素-1と同様の抗原性を有するDNA又はそれに相補的なDNAもしくはRNAを示す。上記ハイブリダイズは、一般にスクリーニング等のDNA又はRNAとDNAをハイブリダイズさせる際に用いられている方法によって行えばよく、例えば、DNAのスクリーニングなどに使用される条件としては、50%ホルムアミド、5×SSPE（塩化ナトリウム／リン酸ナトリウム／EDTA緩衝液）、5×デンハルト溶液（Denhardt's solution）、0.5% SDSと50μg/mlの変性させたサケ精子DNAを含む溶液中で目的DNAをプレハイブリダイズし、<sup>32</sup>Pラベルした本発明DNA（例えば配列番号1記載の塩基配列を有するDNA）を添加し、42℃で16時間ハイブリダイズさせた後、55℃で1×SSPE、1% SDS、さらに0.1×SSPE、0.1% SDSにより洗浄することが挙げられる。一般的なハイブリダイズは上述のような条件下で行われることが多いが、当業者であれば同様のハイブリダイズを目的として各溶液の組成や詳細な条件を変更することにより同様のハイブリダイズを行うことが可能であるため、同様な効果を得ることが可能な条件であれば上述の条件に特に限定はされない。

【0025】本発明DNAが有する塩基配列としてより具体的には、配列番号1に示す全塩基配列又はその部分配列を有するDNAが挙げられ、かつ好ましい。このようなDNAとして具体的には、配列番号1における塩基番号278～1363、365～1363、389～1363、398～1363又は682～826の塩基配列からなるDNAが挙げられる。

【0026】配列番号1に示す塩基配列においては、シアル酸転移酵素-1のcDNAのオープンリーディングフレームの5'末端部に3つのイン・フレームのATGコドンが含まれている。3つのATGコドンの周囲の塩基配列は、全て-3の位置のプリンが保存されている。このことは効率的な翻訳に関するKozakの知見（Kozak, M. (1986) Cell, 44, 283-292）を満足しており、いずれのATGコドンも開始コドンとして機能する可能性がある。

【0027】ところで、β-1, 4-ガラクトシルトラ

ンスフェラーゼは、フレーム内に2つのATGコドンを含むことが知られている(Nakazawa, K. et al. (1988) J. Biochem., 104, 165-168, Shaper, N. et al. (1988) J. Biol. Chem., 263, 10420-10428)。また、Shaperらは、 $\beta$ -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼは、2箇所からの翻訳開始の結果、長いものと短いものとの両方の形態が合成されることを示している。さらに、Lopezらは、長い形態のものは原形質膜を優先的に標的とし、短い形態のものは主としてゴルジ体内に存在することを示唆する証拠を示している(Lopez, L. et al. (1991) J. Biol. Chem., 266, 15984-15991)。同様に、シアル酸転移酵素-1についても、複数のATGコドンが開始コドンとして機能する可能性はあるが、定かではない。しかし、いずれのATGコドンが開始コドンであっても、上記のシアル酸転移酵素-1のポリペプチドをコードする点では同じであり、第2番目、第3番目のATGコドンから始まる塩基配列を有するDNAも本発明に包含されるものである。従って、シアル酸転移酵素-1のポリペプチドは配列番号2記載のアミノ酸配列において少なくともアミノ酸番号41~362に相当する領域を有するものである。

【0028】配列番号1の最初のATGコドンで始まる単一のオープンリーディングフレームからは、362アミノ酸残基からなり、分子量41,754Da、N-結合グリコシレーション部位である可能性のある2カ所の部位を有するタンパク質が予測される。このアミノ酸配列から作成したハイドロパシープロット(図1)から、N末端から16~29番目のアミノ酸残基に渡る長さ14残基の連続した1つの顕著な疎水性部分が認められ、トランスメンブレンドメイン(膜貫通領域)を有することが予想される。

【0029】尚、遺伝暗号の縮重による異なった塩基配列を有するDNAも本発明DNAに包含されることは、当業者であれば容易に理解されるところである。

【0030】また、本発明DNAには、本発明DNAに相補的なDNA又はRNAも包含される。さらに本発明DNAは、SAT-1をコードするコード鎖のみの一本鎖であってもよく、この一本鎖およびこれと相補的な配列を有するDNA鎖又はRNA鎖からなる二本鎖であってもよい。

【0031】また、本発明DNAは、SAT-1のポリペプチド全体をコードするコード領域全長の塩基配列を有していてもよく、またSAT-1のポリペプチドの一部をコードする塩基配列を有するものであってもよい。

【0032】上述のようにSAT-1のポリペプチドは膜貫通領域を有するが、膜内の末端にあたるN末端部から当該膜貫通領域を含む領域を欠失したSAT-1のポリペプチドの部分もまた本発明のポリペプチドに包含される。また、このようなポリペプチドがSAT-1とし

ての活性を有する限り、本発明のシアル酸転移酵素に含まれるポリペプチドの範疇である。このようなポリペプチドを具体的に例示すると、例えば配列番号2に示すアミノ酸配列におけるアミノ酸番号30~362、38~362又は41~362などが挙げられる。

【0033】<2>本発明DNAの製造方法

以下、本発明DNAを得る方法について説明する。本発明によりSAT-1のポリペプチドのアミノ酸配列が明らかにされたので、その配列に基づいて作成したオリゴヌクレオチドプライマーを用いるPCR法(ポリメラーゼ・チェイン・リアクション法)によって染色体DNAあるいはmRNAから本発明DNAを増幅することによって取得することも可能である。また、特に以下の各工程からなる発現クローニング法により製造することが可能である。

(1) ヒト由来の癌細胞を分化誘導剤で処理することにより分化させる。

(2) 分化した癌細胞からcDNAライブラリーを作成し、宿主細胞に導入する。

(3) ガングリオシドを細胞膜上に発現した宿主細胞を検出する。

(4) 上記で検出された宿主細胞をソーティングして、ライブラリーを濃縮する。

(5) 濃縮したライブラリーから導入した遺伝子を切り出す。

【0034】スクリーニングによって、通常には上記SAT-1の完全長cDNAを選択する。

【0035】以下に、本発明DNAを製造する方法の一例を具体的に説明する。

(1) 癌細胞の分化誘導

癌細胞としては、ヒト由来の浮遊系細胞が好ましく、そのような癌細胞として血球系のリンパ種及び白血病のヒト由来の細胞が挙げられ好ましい。そのような細胞として、例えばヒト由来のHL-60(ATCC CCL240)、MOLT-4(ATCC CRL1582)、U937(ATCC CRL1593)等の細胞が好ましく、新鮮骨髄性白血病細胞なども用いることが可能である。そのような癌細胞の中でも、特にHL-60が分化誘導を行いやすいため好ましい。培養したこの癌細胞株に分化誘導剤を添加して20時間以上、好ましくは24~48時間程度培養することによって分化を誘導する。培養法としては使用する細胞によって適した条件下で行えばよいが、通常、一般的な細胞培養条件として5~7vol%CO<sub>2</sub>、95~93vol%空気条件下で37~38℃が挙げられる。分化誘導剤としては例えばホルボーレステル(12-O-テトラデカノイルホルボーレステル(TPA)など)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、レチノイン酸(RA)及び1 $\alpha$ ,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>(1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)等が挙げられ、特に限定はされないが、その中でもTPAが多くの白血病細胞株に対し

て比較的同様な分化誘導活性を有するため好ましい。例えば癌細胞としてHL-60、分化誘導剤としてTPAを使用する場合は、24 nM程度のTPA存在下で48時間培養することにより、HL-60は単球・マクロファージ様に分化し、形態の変化が観察される。

【0036】(2) 分化した癌細胞からのcDNAの構築

#### ①分化した癌細胞からのRNAの調製

上記(1)で分化を誘導した癌細胞を好ましくは500~2000×gで遠心処理により回収し、細胞から例えばグアニジンチオシアネート/CsCl法(Kingston, R. E., (1991) in Current Protocols in Molecular Biology, Suppl. 14, Unit 4.2, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, New York)等の公知の方法により全RNAを調製する。このようにして得られる全RNAから、オリゴdT (oligo-(dT)) セルロースカラムクロマトグラフィー等によってポリ(A)・RNAを精製する。

【0037】②ポリ(A)・RNAからのcDNAの構築  
上記ポリ(A)・RNAを鋳型とし、オリゴヌクレオチドプライマーを用いた逆転写PCRにより、癌細胞由来のcDNAを増幅することができる。PCRは、通常の方法と同様にして行えばよいが、具体的方法を示すならば以下の通りである。1 μlのポリ(A)・RNA、それぞれ100 pmolのオリゴdTとランダムオリゴヌクレオチドプライマー、それぞれ500 μMの4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸、200単位のM-MLV逆転写酵素(ギブコBRL(Gibco BRL))、1 mMジチオスレイトール(DTT)、120単位のRNase(リボヌクレアーゼ)インヒビター(宝酒造(株)製)を含む緩衝液(終体積20 μl)を50℃で60分間インキュベートし、cDNA一次鎖を合成する。次に、上記の逆転写反応混合液5 μl、各100 pmolのランダムオリゴヌクレオチドプライマー、それぞれ250 μMの4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸、1.25単位のTaqポリメラーゼを含む反応液(終体積50 μl)に対し、95℃1分、46~62℃1分、72℃2分を35サイクル繰り返し行う。

【0038】このようにして得られた癌細胞のcDNAは、発現ベクターに保持させた後、宿主細胞に導入して宿主細胞をスクリーニングするために使用される。宿主細胞としては、哺乳類由来の細胞株で、ラクトシルセラム陽性である細胞であれば用いることができる。そのような細胞株としては例えばヒトナマルバ(Namalwa)細胞(細井ら:Cytotechnology, 1, 151(1988))、チャイニーズハムスター由来のCHO細胞(ATCC CCL61等)、サル由来のCOS細胞(ATCC CRL 1650等)、マウス由来の3LL細胞(Taniguchi, S. (信州大学加齢適応研究センター))などが挙げられる。しかし、本発明においてSAT-1の酵素活性の検

出をより容易にすることが可能であるため、更にG<sub>03</sub>陰性の培養細胞が好ましい。そのような細胞としては3LL細胞の突然変異株である3LL-HK46細胞(Inokuchi, J. (生化学工業(株)))が挙げられ、好ましい。発現ベクターとしてはpCEV18(Maruyama, K. (東京大学医科学研究所、現東京医科歯科大学)より恵与)、pCXN2(Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J. (Gene, 108, p193-200(1991)))、pFLAG-CMV-2(Eastman Kodak製)、pAGE107(Miyajiら, Cytotechnology, 3, 133(1990))、pAS3-3(特開平2-227075号公報)、pAMoERC3Sc(特開平5-336963号公報)、pCD2

(Chen, C.ら, Mol. Cell. Biol., 7, 2745-2452(1987))などが挙げられ、使用する宿主細胞に合わせて適宜選択される。例えば宿主細胞として3LL-HK46を使用した場合は、pCEV18を発現ベクターとして使用することが好ましい。上記で癌細胞のポリ(A)・RNAを基に調製されたPCR産物のベクターへの導入は、公知の方法から使用するベクターに適した方法が選択される。

【0039】③cDNAライブラリーの宿主細胞への導入

上記の方法により構築したcDNAライブラリーを公知の手法を用いて宿主細胞へトランスフェクションする。具体的には、例えばエレクトロポレーション法(Miyajiら, Cytotechnology, 3, 133(1990))、リン酸カルシウム法(特開平2-227075号公報)及びリポフェクション法(Philip, L.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987))などが挙げられ適宜選択されるが、エレクトロポレーション法が好ましい。また、ヒトα2-8シアル酸転移酵素は、G<sub>03</sub>からG<sub>03</sub>を合成する酵素であり、該酵素をコードするDNAを導入した細胞はG<sub>03</sub>合成が可能になると細胞膜上にG<sub>03</sub>を発現し、このG<sub>03</sub>の検出は容易であるので、SAT-1をコードするcDNAを検出する際に、より正確な酵素活性の検出を行うため、ヒトα2-8シアル酸転移酵素をコードするDNA(特開平7-327678号公報など)を宿主細胞に前もってトランスフェクションしておくこと、及び、同時にトランスフェクションすることも可能であり、また、好ましい。従って、例えばベクターとしてpCEV18を使用して構築したcDNAライブラリーを、宿主細胞としてのG<sub>03</sub>合成経路を持たない3LL-HK46細胞に導入する際には、ライブラリーのcDNAを保持したpCEV18を、通常の3LL-HK46細胞に直接トランスフェクションしてもよいし、また、α2-8シアル酸転移酵素のcDNA導入したベクターと同時に3LL-HK46細胞にトランスフェクションしてもよい。また更に、予めα2-8シアル酸転移酵素を発現する3LL-ST28細胞に上記ライブラリーのcDNAを保持したpCEV18等の真核生物発現ベク



ターを用いてトランスフェクションしてもよい。なお、3LL-ST28は、3LL-HK46細胞に $\alpha 2-8$ シアル酸転移酵素のcDNAを、pCEV18を用いて導入して作成したものである。

【0040】(3) ガングリオシドを発現した宿主細胞の検出

cDNAライブラリーを導入した宿主細胞は、一般的な細胞培養条件下で培養される。cDNAを導入して24時間後以降、好ましくは36~48時間後に宿主細胞を抗ガングリオシド抗体あるいはガングリオシドに結合するレクチンを用いた免疫染色により染色するが、抗体を用いる染色法がより正確であり好ましい。例えば、宿主細胞として3LL-HK46を用いた場合には、細胞膜上に発現したG<sub>D3</sub>を認識する例えば抗G<sub>D3</sub>モノクローナル抗体 M2590 [L612 (ATCC CRL10724) が産生するモノクローナル抗体: J. Biol. Chem., 260, 13328-13333 (1985)] を用いて検出する。免疫染色は一般的な方法に従って行えばよい。また、宿主細胞として例えば上記の3LL-ST28を用いた場合には、本発明DNAが導入された際に生成されるG<sub>D3</sub>を検出する。G<sub>D3</sub>を検出するための免疫染色法としては通常用いられる一般的な方法(特開平2-327678号公報)によって行うことができる。その際に、使用する一次抗体としてはG<sub>D3</sub>を認識する抗体であれば特に限定はされないが、モノクローナル抗体が好ましく、そのような抗体としては例えば抗G<sub>D3</sub>モノクローナル抗体 R24 [ハイブリドーマ(ATCC HB8445) が産生するモノクローナル抗体: Cancer Res., 49, p191-196 (1989)] などが挙げられ、好ましい。上記の一般的な抗体を用いる免疫染色法が具体例として挙げられる。すなわち、上記培養後の宿主細胞(1×10<sup>5</sup>個)をBSA溶液(0.1%BSA PBS(+))で2~3回程度遠心洗浄し、一次抗体を含む100 $\mu$ lの前記BSA溶液に懸濁する。30分間氷冷下で反応させた後、上記BSA溶液で2回程度洗浄する。さらに一次抗体に対するFITC標識二次抗体1 $\mu$ lを含むBSA溶液100 $\mu$ l中で、氷冷条件下で30分間反応させる。BSA溶液で1回洗浄し、フローサイトメーター(FACScalibur: ベクトン・デッキンソン(Becton Dickinson)製)で、蛍光が強い細胞を検出する。蛍光の強い、例えば全体の5%の細胞をセルソーターで選別し、これからプラスミドDNAを抽出する。プラスミドDNAの宿主細胞からの抽出は一般的な公知の方法によって行われる。

【0041】(4) SAT-1のcDNAのソーティングとcDNAの取得

上記の操作により得られたプラスミドDNAを、適当な宿主細胞株にトランスフェクションし、例えば上記抗G<sub>D3</sub>抗体を用いる免疫染色とフローサイトメーターによる全体の5%の強い蛍光を発する細胞の回収の操作を2回以上繰り返し、目的のcDNAをソーティングにより濃

縮する。前記ソーティングに用いる宿主細胞としては、哺乳類の培養細胞が好ましく、特に3LL-HK46が好ましい。また、使用するベクターとしては哺乳類細胞用の発現ベクターであれば特に限定はされないが、pCEV18が好ましい。ソーティングによって濃縮した目的のcDNAを保持した前記ベクターを、pBCKMV(ストラタジーン社製)などの哺乳類細胞用の発現ベクターにヒト $\alpha 2-8$ シアル酸転移酵素のcDNAを導入して作成した発現ベクターと同時に、3LL-HK46細胞等のG<sub>D3</sub>合成経路を有さない哺乳類由来の培養細胞にトランスフェクションし、上記と同様に免疫染色及びフローサイトメーターによる検出を行い、強蛍光を発する全体の5%の細胞を得る。この細胞から公知の方法によりプラスミドDNAを抽出する。このプラスミドDNAから一般的な方法によってcDNAを切り出して得られたcDNAにより、大腸菌DH10B(E. coli DH10B: ギブコ社製)を形質転換し、これらを一穴あたり100コロニーを形成するよう植菌し、シブセレクションを行うことにより、最終的に約2.1Kbpのインサート(4C7)を含む単一のクローン、pCEV4C7を得ることができる。

【0042】(5) SAT-1をコードするcDNA 4C7の塩基配列の決定

上記のようにして得られたcDNAはそのままあるいはpCRIIなどの適当なプラスミドにサブクレーニングして、既知の一般的な方法により塩基配列を決定することができる。

【0043】上記のようにして決定されたSAT-1をコードするcDNAの塩基配列及びこの塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号1に、アミノ酸配列のみを配列番号2に示す。

【0044】また、膜貫通領域を欠失した、すなわち可溶性タンパク質形態のSAT-1のポリペプチドをコードするDNAは以下のようにして取得することが可能である。すなわち、まず配列番号1に示す塩基配列に基づき、当該酵素のポリペプチドのN-末端側で適当な短縮化形態となるように選択したプライマーを合成し、クローン化したSAT-1のcDNAを鋳型としてPCR法により増幅する。例えば、N-末端の37アミノ酸残基が欠失した短縮化形態のポリペプチドをコードするDNAを得る場合には、例えば目的とする塩基配列の3'及び5'末端部に存在する塩基配列を基にオリゴヌクレオチドプライマーを合成する。例えば配列番号3及び4に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーをそれぞれ5'プライマー及び3'プライマーとして用いてPCRを行えばよい。次いで、増幅して得られたPCR産物を必要により精製して目的DNAを得ることが可能である。

【0045】<3>本発明DNAの塩基配列によってコードされるSAT-1のポリペプチド

本発明は、上記の本発明DNAによってコードされるSAT-1のポリペプチドも提供する。本ポリペプチドは単独であってもよいし、他のポリペプチドと融合していてもよい。また、膜貫通領域を欠失していてもよい。

【0046】本ポリペプチドは、糖鎖を有していても有していなくてもよい。また、糖鎖の種類にも特に限定はない。

【0047】このようなポリペプチドは、例えば、後記のポリペプチドの製造方法によって得ることができ、また、上記の活性ないし機能の有無を判定することは、特開平7-327678号公報記載の酵素活性測定法において、宿主細胞に導入するcDNAと酵素の基質を変更することにより実施することが可能であり、例えば本明細書中に具体的に記載されている方法により、当業者であれば容易に行うことができる。

【0048】＜4＞本発明DNAを利用したSAT-1又はそのポリペプチドの製造方法

上記本発明DNAで形質転換された細胞を、好適な培地で培養し、本発明DNAがコードするSAT-1又はそのポリペプチドを培養物中に生成蓄積させ、その培養物からSAT-1又はそのポリペプチドを採取することによって、SAT-1又はそのポリペプチドを製造することができる。

【0049】本発明DNAで形質転換された細胞は、公知の発現ベクターに本発明DNAの断片を挿入して組換えプラスミドを構築し、この組換えプラスミドを用いて形質転換を行うことによって得ることができる。なお、本発明は、本発明酵素の製造に使用できる、本発明DNAを含む組換えプラスミドすなわち組換えベクター及び本発明DNAが導入されており、かつ該DNAが発現可能な形質転換体（例えば、上記組換えベクターを含む形質転換体）も提供するものである。細胞としては大腸菌等の原核細胞や、哺乳類細胞等の真核細胞が例示される。大腸菌などの原核細胞を用いた際は、本発明DNAの発現によって生じるSAT-1のポリペプチドに糖鎖の付加が起こらないため、純粋にSAT-1のポリペプチドのみを得ることが可能であり、また、哺乳類細胞等の真核細胞を用いた際は、本発明DNAの発現によって生じるSAT-1のポリペプチドに糖鎖が付加される。そのため、糖鎖も含む通常のSAT-1と同様の形態で得ることが可能である。

【0050】本製造方法においては、タンパク質の製造に通常用いられる宿主-ベクター系を使用することができる。3LL-HK46細胞、3LL-ST28細胞又はCOS-1細胞等の哺乳類由来の培養細胞とpCEV18、pME18S（丸山ら、Med. Immunol., 20, 27(1990)）等の哺乳類細胞用発現ベクターとの組み合わせを採用することが好ましいが、特に限定はされない。培地や培養条件は、用いる宿主すなわち細胞に合わせて適宜選択される。

【0051】本発明DNAは全長を直接発現させてもよいが、他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして発現させてもよい。また、本発明DNAの一部を部分ペプチドとして発現させてもよい。

【0052】上記融合ポリペプチドを発現する組み換えプラスミドの構築の具体例としては以下の方法が挙げられる。すなわち、pGIR201protA（Kitagawa, H. and Paulson, J. C., J. Biol. Chem., 269, 1394-1401(1994)）等のプラスミドに導入した遺伝子を融合タンパクとして発現させるように構築されたベクターに通常の方法により本発明のDNAを組み込み、複数のタンパク質の遺伝子を同一読み出し領域に有するベクターを構築する。ついで、このベクターから融合タンパク質をコードするNheI断片を切り出し、上記と同様の操作によりpCEV18等の適当なベクターに連結させる。

【0053】培養物からのSAT-1又はそのポリペプチドの採取は、公知のポリペプチドの精製方法によって行うことができる。具体的には例えば、ラクトシルセラミドあるいはCMP-シアル酸などを結合したセファロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーが挙げられる。また融合ポリペプチドとして発現させた場合は、宿主細胞の培養物を、SAT-1と融合したポリペプチドに対し親和性の高い物質（例えば抗体など）を結合したアフィニティークロマトグラフィーに付することによって融合ポリペプチドを精製することが可能である。さらに、SAT-1と他のポリペプチドとの間にリンカー、例えば特定のタンパク分解酵素が認識して切断するアミノ酸配列を有するリンカーを予め組み込んでおくことにより、融合ポリペプチドを精製した後にリンカー部位で融合ポリペプチドを切断することにより、SAT-1を得ることが可能である。上記特定のタンパク質分解酵素とそれが認識する特定の配列の組合せとしては例えばプロインスリンの合成時に働くシグナルペプチダーゼとインスリンのシグナルペプチドの組合せが挙げられる。なお上記の培養物には、培地および当該培地中の細胞が包含される。

【0054】シアル酸転移酵素の活性の測定方法としては、一般的なガングリオシド合成の測定法（特開平7-327678号公報など）において酵素の基質を変更することにより実施することが可能である。例えば上記培養物又は上記方法によって精製した酵素適量を、100mM カコジル酸ナトリウム、10mM 塩化マンガン、0.2mM CMP-放射性物質標識シアル酸、0.4mM ラクトシルセラミド、0.3% Triton CF-54を含む反応液をpH6.5に調整し、37℃で2時間保温した後、一般的な薄層クロマトグラフィーにより反応産物を展開し、フジックスBAS2000バイオ・イメージング・アナライザー（富士写真フイルム（株）製）により活性の測定を行うことができる。

【0055】

【実施例】以下に本発明を実施例によりさらに詳説するが、本発明の目的を超えない限りこれに限定されるものではない。

【0056】(1) HL-60細胞の分化誘導とcDNAの構築

2~3×10<sup>5</sup>個/ml HL-60をTPA 24nM、及10%牛胎児血清を含むRPMI-1640(ニッスイ製)中で5vol%CO<sub>2</sub>、95vol%空気、37℃の条件下で48時間培養し、分化を誘導した。上記細胞から、インビトロゲン社製のFast Track mRNA単離キット

を用いてポリ(A)・シグナルを有するRNAを単離した。【0057】このポリ(A)・RNAを逆転写反応の鋳型とし、DNAの一次鎖を構築し、更にこのDNAを用いて2本鎖cDNAを合成した(Gubber, V. and Hoffman, B.J., Gene, 25, 283(1983))。

【0058】このようにして得られた2本鎖cDNAに、制限酵素BstXIアダプター(インビトロゲン社製)を連結し、pCEV18のBSTXI部位に導入してcDNAライブラリーを構築した。このcDNAライブラリーを8つに分け、E. coli DH10B(ライフテクノロジー社製)に導入して増幅した。増幅したcDNAは、Qiagen社製のQiagen Tipを用いてプラスミドDNAを精製した。

【0059】(2) cDNAの3LL-HK46細胞へのトランスフェクション

上記のcDNAライブラリーを含むプラスミドDNA100μgを、5×10<sup>6</sup>個の3LL-HK46細胞にエレクトロポレーション法(180V、600μF)を用いて導入し、38~48時間、5vol%CO<sub>2</sub>、95vol%空気、37℃条件下で培養をした。

【0060】(3) ガングリオシドを発現した宿主細胞の検出とcDNAの調製

培養後の3LL-HK46細胞を回収してPBS(-)で洗浄した後、抗G<sub>M3</sub>抗体であるM2590と30分間、氷冷下で反応させ、さらに氷冷下で30分間、FITC標識ウサギ抗マウスIgMモノクローナル抗体により免疫染色を行った。この染色した細胞をフローサイトメーター(FACScalibur)で蛍光が陽性の細胞を検出し、陽性側の5%の細胞をコウルター社製のEPICS EliteESPセルソーターで回収し、プラスミドDNAを調製した後、さらに2回、3LL-HK46細胞へのエレクトロポレーション法による導入と48時間培養、免疫染色及びフローサイトメーターによる検出、回収を繰り返した。

【0061】この方法で最終的に得られたプラスミドを、pBKCMVGD3(ストラタジーン社製のpBKCMVプラスミドベクターにヒトα2-8シアル酸転移酵素(G<sub>M3</sub>合成酵素)を導入したプラスミド)と共に5×10<sup>6</sup>個の3LL-HK46細胞に導入した。この細胞を48時間培養した後、抗G<sub>M3</sub>抗体であるR24とF1

TC標識ウサギ抗マウスIgG抗体で免疫染色して、フローサイトメーターにより蛍光の強い細胞を検出し、蛍光が強い側の0.6%の細胞を、ベクトンディッキンソン社製のFACS Vantageセルソーターを用いて回収した。

【0062】この細胞から、プラスミドDNAを調製し、エレクトロポレーション法によりこのプラスミドDNAで大腸菌DH10B(ライフテクノロジー社製)を形質転換した。トランスフェクションとアンピシリンによる選別とを2回繰り返した後、陽性コロニー群を96穴マイクロプレート1穴あたり100コロニーの割合で小分けした。9枚のマイクロプレートに植菌し、シブセレクション法を行い1穴に絞り込み、この1穴に由来する2,400コロニーを1穴あたり1コロニーの割合で、96穴マルチプレート25枚に広げ、更にシブセレクションを行い陽性クローン(pCEV4C7)を得た。

【0063】特に3LL-ST28細胞を宿主細胞として使用すると、3LL-HK46細胞に本発明DNAを含むプラスミドDNAとpBKCMVGD3を共導入する方法と比較してフローサイトメトリー上で3倍以上の蛍光強度が得られたので、上述のシブセレクションにおいては共導入法ではなく、宿主細胞として3LL-ST28細胞を用いた。

【0064】(4) 塩基配列の決定

pCEV4C7の二本鎖DNAの塩基配列を、オートサイクルシーケンシングキット(ファルマシア社製)と、ファルマシアA.L.F. DNAシーケンサー(ファルマシア社製)を用いたデオキシチェンターミネーション法により決定した。このように決定された塩基配列とその塩基配列から予測されるアミノ酸配列を配列番号1に、アミノ酸配列のみを配列番号2に示す。pCEV4C7が有するcDNAインサート4C7は2,359kbpであり、278番目の塩基を翻訳開始点とする362アミノ酸残基を有するタンパク質(分子量41,754Da)をコードすることが明かとなった。アミノ酸配列から予測される構造の模式図を図1に示す。ハイドロパシープロットによる解析の結果、N末端部15番目から33番目のアミノ酸残基の領域に膜貫通領域が存在する2型膜タンパク質であることが判明した。この配列をGenBankに登録されている遺伝子データベースで検索した結果、高度に相同性を示す配列は認められなかった。しかし、シアル酸転移酵素の配列の中央部及びC末端側領域に存在するシアル酸転移酵素相同領域のシアリルモチーフ(L及びS)については、多少の置換が見られたものの、比較的高い相同性が認められた(図2)。比較に用いたシアル酸転移酵素は、ST3N-1; Biochem. Biophys. Res. Commun., 194, 375-382, 1993, ST3N-2; J. Biol. Chem., 268, 22782-22787, 1993, ST30-1; J. Biol. Chem., 269, 17872-17878, 1994, ST30-2; Eur. J. Biochem., 247, 558-566, 1997, STh<sup>TM</sup>; GenBank<sup>TM</sup> デ

ータベース、受入番号U14550、ST6N; J. Exp. Med., 172, 641-643, 1990、SAT-II; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 7952-7956, 1994、STX; J. Biol. Chem., 270, 22685-22688, 1995、ST8SiaIII; GenBank™ データベース、受入番号AF004668、PST-1; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92, 7031-7035, 1995、ST8SiaV; Biochem. Biophys. Res. Commun., 235, 327-330, 1997のそれぞれに記載の11種である。この結果から、pCEV4C7のインサート4C7がコードするSAT-1はシアル酸転移酵素ファミリーに属すると裏付けられた。本発明DNAがコードするSAT-1には、シアリルモチーフL中に存在する177番目のアミノ酸において、他のシアル酸転移酵素と比較して特徴的なアミノ酸の置換が存在し(アスパラギン酸からヒスチジンへの置換)、またアミノ酸配列からN-グリコシレーションサイトにコンセンサスな配列が2つ存在することが示された(図1中、△で示す)。

【0065】(5) SAT-1のcDNAを発現した細胞のG<sub>M3</sub>合成

上記SAT-1をコードするcDNA(4C7)を発現ベクターpCEV18に導入したpCEV4C7を、エレクトロポレーション法により3LL-HK46及び3LL-ST28に導入し、48時間培養後のこの細胞のG<sub>M3</sub>合成活性を以下の方法により測定した。対照としては、pCEV18を上記と同様に3LL-HK46及び3LL-ST28に導入した。0.1mM CMP-[<sup>14</sup>C]-シアル酸(2×10<sup>3</sup>CPM)、0.4mMラクトシルセラミド、0.3%(W/V)Triton CF-54、10mM MgCl<sub>2</sub>、100mM カコジル酸ナトリウム、150μgのpCEV4C7(又は対照ベクター)を導入した宿主細胞のホモジナイズ液及び1mMのシアリダーゼ阻害剤(2,3-デヒドロ-2-デオキシ-N-アセチルシアル酸(2,3-dehydro-2-deoxy-NeuAc):ペーリンガー・マンハイム社製)を含むpH6.5の20μlの反応液を、37℃で2時間インキュベートした後、SepPak C18カラム(メルク社製)で脂質成分を精製した。精製物を乾固後、シリカゲル薄層クロマトグラフィー60HP TLCプレート(メルク社製)に供した。クロロホルム-メタノール-0.5%CaCl<sub>2</sub>水溶液(55:45:10, V/V/V)にて展開後、オルシノール硫酸により発色すると共に、ガングリオシドに取り込まれた放射活性をフジックスBAS2000バイオ・イメージング・アナライザー(富士写真フイルム(株)製)で測定した。その結果、pCEV4C7導入細胞において、<sup>14</sup>CのガングリオシドG<sub>M3</sub>への取り込みが検出され、SAT-1によるG<sub>M3</sub>合成が起こっていることが明らかになった。

【0066】G<sub>M3</sub>合成活性は、pH6.0~7.0、特にpH6.5付近で高く、また、10mM Mn<sup>2+</sup>存在下で1.5倍以上上昇した。

【0067】また、上述のpCEV4C7を導入した3LL-HK46細胞及び3LL-ST28細胞を、導入24時間後に免疫蛍光染色(3LL-HK46細胞については抗G<sub>M3</sub>抗体M2590、3LL-ST28細胞については抗G<sub>M3</sub>抗体R24をそれぞれ一次抗体として使用し、FITCを結合した抗マウスIgM抗体又はIgG抗体を二次抗体として使用した)し、フローサイトメトリーを用いて、染色された細胞の分布を測定した。対照としてpCEV18を導入したそれぞれの宿主細胞を免疫染色した細胞を使用した。結果を図4に示す。a及びbは3LL-ST28細胞、c及びdは3LL-HK46細胞であり、a及びcはpCEV18を導入したもの(対照)、b及びdはpCEV4C7を導入したものである。本発明DNAを保持したプラスミドDNAを導入した3LL-ST28が顕著な染色性を示していることが明らかである。3LL-HK46細胞においてこの方法によるG<sub>M3</sub>の検出が難しかったことは、細胞系により、細胞表面でのG<sub>M3</sub>の局在性等が異なることを示唆している。

【0068】(6) 組織等におけるSAT-1の発現 組織等におけるSAT-1の発現をノザンブロッティング法により確認した。すなわち、クロンテック社製のMTNプロットを使用し、pCEV4C7からEcoRIで切り出した2,066 bpのcDNAをアガロースゲル電気泳動で調製し、常法に従って[α<sup>32</sup>P]dCTPを用いて放射能ラベルを行って、放射能ラベルプローブを調製した。サンプル中のRNA量の標準化を行うために、内部標準としては放射能ラベルをしたヒトグリセルアルデヒド-3リン酸デヒドロゲナーゼのプローブを使用した。その結果、脳、胎盤、骨格筋、及び精巣において特にSAT-1が強く発現していることが明らかとなり、肝臓、腎臓、脾臓、及び大腸においては発現量が特に少ないことが明らかとなった。また、脳、胎盤、肺、骨格筋、脾臓、及び末梢血において、約7 kbの薄いバンドが現れた。

【0069】脳におけるSAT-1の発現を詳細に調べるために、同じプローブを用いて小脳、大脳皮質、髄質、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、脊髄のノザンブロッティングも行った結果、大脳皮質、前頭葉、及び被殻において若干強く発現していたが、全体に渡って比較的強く発現していることが判明した。

【0070】

【発明の効果】本発明によりラクトシルセラミドから細胞分化を誘導するガングリオシドG<sub>M3</sub>を合成するα2-3シアル酸転移酵素(SAT-1)のDNAが提供される。また、本発明により、G<sub>M3</sub>合成酵素であるα2-3シアル酸転移酵素が、上記DNAを使用することで容易に得られる。

【0071】本発明により、SAT-1をコードするDNAが得られたので、その発現機構を解明することによる細胞分化のメカニズムの解明が期待される。

【0072】

【配列表】

<110> 生化学工業株式会社  
 <120> ヒト由来シアル酸転移酵素及びそれをコードするDNA  
 <130> P-6547  
 <160> 5  
 <210> 1  
 <211> 2359  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (278)..(1363)  
 <400> 1  
 ctgagcgggg gagcggcggc cccagctga atgggcgcga gagcggcgct gggggcgggt 60  
 gggggcgcgg ggtaccgggc tggcggccgg cggcgcccc ctcatagta tgcggacgaa 120  
 ggcggcgggc tgcgcggagc ggcgtcccct gcagccgcgg accgaggcag cggcggcacc 180  
 tgccggccga gcaatgccaa gtgagtacac ctatgtgaaa ctgagaagtg attgctcgag 240  
 gccttccttg caatggtaca cccgagctca aagcaag atg aga agg ccc agc ttg 295  
 Met Arg Arg Pro Ser Leu  
 1 5  
 tta tta aaa gac atc ctc aaa tgt aca ttg ctt gtg ttt gga gtg tgg 343  
 Leu Leu Lys Asp Ile Leu Lys Cys Thr Leu Leu Val Phe Gly Val Trp  
 10 15 20  
 atc ctt tat atc ctc aag tta aat tat act act gaa gaa tgt gac atg 391  
 Ile Leu Tyr Ile Leu Lys Leu Asn Tyr Thr Thr Glu Glu Cys Asp Met  
 25 30 35  
 aaa aaa atg cat tat gtg gac cct gac cgt gta aag aga gct cag aaa 439  
 Lys Lys Met His Tyr Val Asp Pro Asp Arg Val Lys Arg Ala Gln Lys  
 40 45 50  
 tat gct cag caa gtc ttg cag aag gaa tgt cgt ccc aag ttt gcc aag 487  
 Tyr Ala Gln Gln Val Leu Gln Lys Glu Cys Arg Pro Lys Phe Ala Lys  
 55 60 65 70  
 aca tca atg gcg ctg tta ttt gag cac agg tat agc gtg gac tta ctc 535  
 Thr Ser Met Ala Leu Leu Phe Glu His Arg Tyr Ser Val Asp Leu Leu  
 75 80 85  
 cct ttt gtg cag aag gcc ccc aaa gac agt gaa gct gag tcc aag tac 583  
 Pro Phe Val Gln Lys Ala Pro Lys Asp Ser Glu Ala Glu Ser Lys Tyr  
 90 95 100  
 gat cct cct ttt ggg ttc cgg aag ttc tcc agt aaa gtc cag acc ctc 631  
 Asp Pro Pro Phe Gly Phe Arg Lys Phe Ser Ser Lys Val Gln Thr Leu  
 105 110 115  
 ttg gaa ctc ttg cca gag cac gac ctc cct gaa cac ttg aaa gcc aag 679  
 Leu Glu Leu Leu Pro Glu His Asp Leu Pro Glu His Leu Lys Ala Lys  
 120 125 130  
 acc tgt cgg cgc tgt gtg gtt att gga agc gga gga ata ctg cac gga 727  
 Thr Cys Arg Arg Cys Val Val Ile Gly Ser Gly Gly Ile Leu His Gly  
 135 140 145 150  
 tta gaa ctg ggc cac acc ctg aac cag ttc gat gtt gtg ata agg tta 775  
 Leu Glu Leu Gly His Thr Leu Asn Gln Phe Asp Val Val Ile Arg Leu  
 155 160 165

21	22
aac agt gca cca gtt gag gga tat tca gaa cat gtt gga aat aaa act Asn Ser Ala Pro Val Glu Gly Tyr Ser Glu His Val Gly Asn Lys Thr 170 175 180	823
act ata agg atg act tat cca gag ggc gca cca ctg tct gac ctt gaa Thr Ile Arg Met Thr Tyr Pro Glu Gly Ala Pro Leu Ser Asp Leu Glu 185 190 195	871
tat tat tcc aat gac tta ttt gtt gct gtt tta ttt aag agt gtt gat Tyr Tyr Ser Asn Asp Leu Phe Val Ala Val Leu Phe Lys Ser Val Asp 200 205 210	919
ttc aac tgg ctt caa gca atg gta aaa aag gaa acc ctg cca ttc tgg Phe Asn Trp Leu Gln Ala Met Val Lys Lys Glu Thr Leu Pro Phe Trp 215 220 225 230	967
gta cga ctc ttc ttt tgg aag cag gtg gca gaa aaa atc cca ctg cag Val Arg Leu Phe Phe Trp Lys Gln Val Ala Glu Lys Ile Pro Leu Gln 235 240 245	1015
cca aaa cat ttc agg att ttg aat cca gtt atc atc aaa gag act gcc Pro Lys His Phe Arg Ile Leu Asn Pro Val Ile Ile Lys Glu Thr Ala 250 255 260	1063
ttt gac atc ctt cag tac tca gag cct cag tca agg ttc tgg ggc cga Phe Asp Ile Leu Gln Tyr Ser Glu Pro Gln Ser Arg Phe Trp Gly Arg 265 270 275	1111
gat aag aac gtc ccc aca atc ggt gtc att gcc gtt gtc tta gcc aca Asp Lys Asn Val Pro Thr Ile Gly Val Ile Ala Val Val Leu Ala Thr 280 285 290	1159
cat ctg tgc gat gaa gtc agt ttg gcg ggt ttt gga tat gac ctc aat His Leu Cys Asp Glu Val Ser Leu Ala Gly Phe Gly Tyr Asp Leu Asn 295 300 305 310	1207
caa ccc aga aca cct ttg cac tac ttc gac agt caa tgc atg gct gct Gln Pro Arg Thr Pro Leu His Tyr Phe Asp Ser Gln Cys Met Ala Ala 315 320 325	1255
atg aac ttt cag acc atg cat aat gtg aca acg gaa acc aag ttc ctc Met Asn Phe Gln Thr Met His Asn Val Thr Thr Glu Thr Lys Phe Leu 330 335 340	1303
tta aag ctg gtc aaa gag gga gtg gtg aaa gat ctc agt gga ggc att Leu Lys Leu Val Lys Glu Gly Val Val Lys Asp Leu Ser Gly Gly Ile 345 350 355	1351
gat cgt gaa ttt tgaacacaga aaacctcagt tgaaaaatgca actctaactc Asp Arg Glu Phe 360	1403
tgagagctgt ttttgacagc cttcttgatg tattttctcca tcttcagat actttgaagt gcagctcatg tttttaactt ttaattttaa aacacaaaaa aaattttagc tcttccact tttttttccc tatttatttg aggtcagtggt ttgtttttgc acaccatttt gtaaatgaaa cttaagaatt gaattggaaa gacttctcaa agagaattgt atgtaacgat gttgtattga tttttaagaa agtaatttaa tttgtaaaac ttctgctcgt ttactactgca cattgaatac aggtaactaa ttggaaggag aggggagggtc actcttttga tgggtggccct gaacctcatt ctggttccct gctgcgctgc ttgggtgtgac ccacggagga tccactcca ggatgacgtg ctccgtagct ctgctgctga tactgggtct gcgatgcagc ggctgtaggc ctgggctggt tggagaaggc cacaaccctt ctctgttggc ctgccttctg ctgaaagact cgagaaccaa ccagggaagc tgtcctggag gtccctgggc ggagagggac atagaatctg tgacctctga caactgtgaa gccacctgg gctacagaaa ccacagtctt cccagcaatt attacaattc	1463 1523 1583 1643 1703 1763 1823 1883 1943 2003 2063

23

24

ttgaattcct tggggatttt ttactgccct ttcaaagcac ttaagtgtta gatctaactg 2123  
 gttccagtgt ctgtctgagg tgacttaaaa aatcagaaca aaacttctat tatccagagt 2183  
 catgggagag tacacccttt ccaggaataa tgttttggga aacactgaaa tgaaatcttc 2243  
 ccagtattat aaattgtgta tttaaaaaaa agaaactttt ctgaatgcct acctggcggt 2303  
 gtataccagg cagtgtgcca gtttaaaaag atgaaaaaga ataaaaactt ttgagg 2359

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 362

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met	Arg	Arg	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Lys	Asp	Ile	Leu	Lys	Cys	Thr	Leu
1			5					10					15		
Leu	Val	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Leu	Tyr	Ile	Leu	Lys	Leu	Asn	Tyr	Thr
			20					25					30		
Thr	Glu	Glu	Cys	Asp	Met	Lys	Lys	Met	His	Tyr	Val	Asp	Pro	Asp	Arg
			35					40					45		
Val	Lys	Arg	Ala	Gln	Lys	Tyr	Ala	Gln	Gln	Val	Leu	Gln	Lys	Glu	Cys
			50					55					60		
Arg	Pro	Lys	Phe	Ala	Lys	Thr	Ser	Met	Ala	Leu	Leu	Phe	Glu	His	Arg
			65					70					75		80
Tyr	Ser	Val	Asp	Leu	Leu	Pro	Phe	Val	Gln	Lys	Ala	Pro	Lys	Asp	Ser
			85					90					95		
Glu	Ala	Glu	Ser	Lys	Tyr	Asp	Pro	Pro	Phe	Gly	Phe	Arg	Lys	Phe	Ser
			100					105					110		
Ser	Lys	Val	Gln	Thr	Leu	Leu	Glu	Leu	Leu	Pro	Glu	His	Asp	Leu	Pro
			115					120					125		
Glu	His	Leu	Lys	Ala	Lys	Thr	Cys	Arg	Arg	Cys	Val	Val	Ile	Gly	Ser
			130					135					140		
Gly	Gly	Ile	Leu	His	Gly	Leu	Glu	Leu	Gly	His	Thr	Leu	Asn	Gln	Phe
			145					150					155		160
Asp	Val	Val	Ile	Arg	Leu	Asn	Ser	Ala	Pro	Val	Glu	Gly	Tyr	Ser	Glu
			165					170					175		
His	Val	Gly	Asn	Lys	Thr	Thr	Ile	Arg	Met	Thr	Tyr	Pro	Glu	Gly	Ala
			180					185					190		
Pro	Leu	Ser	Asp	Leu	Glu	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Asp	Leu	Phe	Val	Ala	Val
			195					200					205		
Leu	Phe	Lys	Ser	Val	Asp	Phe	Asn	Trp	Leu	Gln	Ala	Met	Val	Lys	Lys
			210					215					220		
Glu	Thr	Leu	Pro	Phe	Trp	Val	Arg	Leu	Phe	Phe	Trp	Lys	Gln	Val	Ala
			225					230					235		240
Glu	Lys	Ile	Pro	Leu	Gln	Pro	Lys	His	Phe	Arg	Ile	Leu	Asn	Pro	Val
			245					250					255		
Ile	Ile	Lys	Glu	Thr	Ala	Phe	Asp	Ile	Leu	Gln	Tyr	Ser	Glu	Pro	Gln
			260					265					270		
Ser	Arg	Phe	Trp	Gly	Arg	Asp	Lys	Asn	Val	Pro	Thr	Ile	Gly	Val	Ile
			275					280					285		
Ala	Val	Val	Leu	Ala	Thr	His	Leu	Cys	Asp	Glu	Val	Ser	Leu	Ala	Gly
			290					295					300		
Phe	Gly	Tyr	Asp	Leu	Asn	Gln	Pro	Arg	Thr	Pro	Leu	His	Tyr	Phe	Asp
			305					310					315		320

25 26

Ser Gln Cys Met Ala Ala Met Asn Phe Gln Thr Met His Asn Val Thr  
 325 330 335

Thr Glu Thr Lys Phe Leu Leu Lys Leu Val Lys Glu Gly Val Val Lys  
 340 345 350

Asp Leu Ser Gly Gly Ile Asp Arg Glu Phe  
 355 360

<210> 3  
 <211> 17  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

atgaaaagaa tgcacta

17

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

30

<400> 4

tcagtggatg ccgctga

17

<210> 5

<211> 48

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Cys Arg Arg Cys Val Val Ile Gly Ser Gly Gly Ile Leu His Gly Leu

1

5

10

15

Glu Leu Gly His Thr Leu Asn Gln Phe Asp Val Val Ile Arg Leu Asn

20

25

30

Ser Ala Pro Val Gln Gly Tyr Ser Glu His Val Gly Asn Lys Thr Thr

35

40

45

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の  $\alpha$  2-3 シアル酸転移酵素 (SAT-1) の構造の模式図。△は、アミノ酸配列から推定される N-グリコシレーション部位である。TM はアミノ酸配列から推定される膜貫通領域である。

【図 2】 SAT-1 のシアルリモチーフ (L 及び S) 領域のアミノ酸配列と、他のシアル酸転移酵素のシアリ

ルモチーフ領域との対比を示す図。白抜き文字は 1 種類のシアル酸転移酵素のみが他と異なったアミノ酸残基を示す部位である。

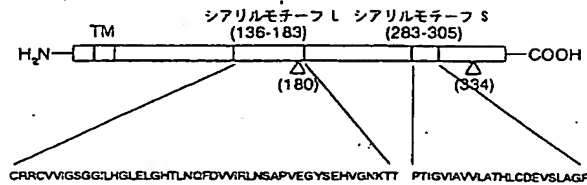
【図 3】 本発明 DNA から推定した SAT-1 のアミノ酸配列のハイドロパシープロット。

【図 4】 形質転換細胞におけるガングリオシド G<sub>M3</sub> の発現の、フローサイトメトリーによる分析結果。縦軸は

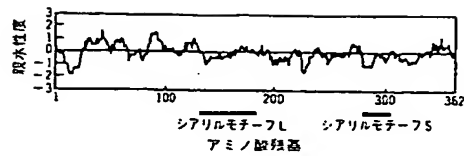


細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

【図1】



【図3】



【図4】

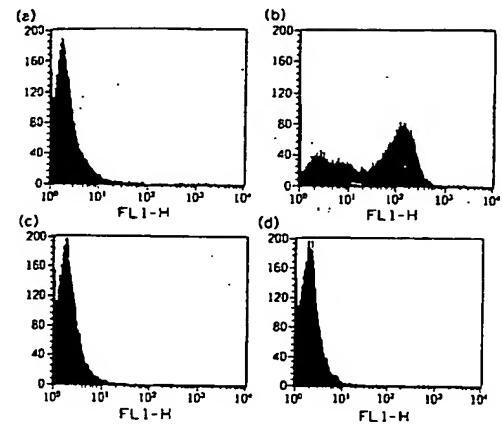
【図2】

## シアルルモチーフ L

SAT-1	136	CRRCVVIGSG	GILHGLELGH	TLNQFDVVIR	LNSAPV-EGY	SEHVGKTT	183
ST3N-1	157	CRRCIIYVNG	GVLANKSLGS	RIDDYDVVR	LNSAPV-KGF	EKDVGSKTT	204
ST3N-2	113	CRRCVVVNG	RLRNSSLGD	AINKYDVVR	LNSAPV-AGY	EGDVGSKTT	160
ST3O-1	139	CRRCVVVNGS	GNLRESSYGF	EIDSHDVLR	HNQAPT-AGF	EADVGTKTT	186
ST3O-2	149	CRRCVVVNGS	GNLRGSGYGG	DVDGHNFTHA	HNQAPT-VGF	EQDVGSKTT	196
SThM	148	CIRCAVVNG	GILNGSRQGF	NIDAHDTVFR	LNGAII-KGF	ERDVGTKTS	195
ST6N	181	WGRCAVSEA	GSLLASSQLGR	EIDDEDAVLR	FNGAPT-ANF	QQDVGTKTT	228
SAT-II	120	LKKCAVVNG	GILKASGCGR	QIDEANFVHR	CNLFFLSSEY	TKDVGSKSQ	168
STX	154	FGTCAIVNGS	GVLNMSGCGQ	EIDARFVIR	CNLAPV-QEY	ARDVGLKTD	201
ST8SiaIII	159	YNICAVVNGS	GILTTIQCGR	EIDKSDVFVR	CNFAFS-EAF	QRDVGRKTN	206
PST-1	139	FKTCAVVNGS	GILLDECEGR	EIDSHNFVIR	CNLAPV-VEF	AADVGTKSD	186
ST8SiaV	161	FKKCAVVNG	GILKNSRCGR	EINSADFVFR	CNLFPISERY	THDVGVKTD	209

## シアルルモチーフ S

SAT-1	282	PTIGVIAVVL	ATHLCDEVSL	AGF	305
ST3N-1	300	PTLGSVAVTH	ALHGCDEVAV	AGF	322
ST3N-2	255	PTTGLLAITL	ALHLCDLVHI	AGF	277
ST3O-1	267	PSTGILSVIF	SHHVCDEVLD	YGF	289
ST3O-2	277	PSTGMLVLF	ALHVCDEVHV	YGF	299
SThM	303	PSTGALMLT	ALHTCDQVSA	YGF	325
ST6N	321	PSSGMLGIII	MMTLCDDVDI	YGF	343
SAT-II	258	LSTGLFLVSA	ALGLCEEVAI	YGF	280
STX	293	PTTGLLMYTL	ATRFCKQIYL	YGF	315
ST8SiaIII	299	LSTGILMYTL	ASAICEEIH	YGF	321
PST-1	278	PSTGILMYTL	ATRFCDIEHL	YGF	300
ST8SiaV	299	ISTGLILVTA	ALELCEEVHL	YGF	321



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テマコード (参考)

C 1 2 R 1:19)  
(C 1 2 N 9/10  
C 1 2 R 1:19)  
(C 1 2 N 9/10  
C 1 2 R 1:91)

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA10 CA04 CA09  
DA02 DA06 EA04 GA14 GA27  
HA13 HA14 HA15  
4B050 CC01 CC03 DD11 EE01 LL01  
LL03 LL05  
4B065 AA26X AA90X AA93Y AB01  
AC14 AC16 BA03 BA21 BA30  
BC01 BD01 BD25 CA29 CA44  
CA46